

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola  
Összehasonlító Neurobiológia Program



## **A nyálmirigy aminerg és peptiderg szabályozása valamint a nyálelválasztás molekuláris mechanizmusa az éti csigában (*Helix pomatia*)**

**PhD értekezés**

**Pirger Zsolt**

**PÉCS, 2008**

# **A nyálmirigy aminerg és peptiderg szabályozása valamint a nyáleválasztás molekuláris mechanizmusa az éti csigában (*Helix pomatia*)**

**Pirger Zsolt**

**PhD értekezés**

Témavezető:

**Dr. Kiss Tibor, DSc**

Magyar Tudományos Akadémia  
Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany



Pécs-Tihany, 2008

## BEVEZETÉS

A szájníyláson keresztül a szájúregbe jutott táplálék előemésztését, falattá történő formálását, valamint a nyelés elősegítését a nyál biztosítja. A külön szervként elkülönülő nyálmirigy a soksertéjű gyűrűsférgeknél jelenik meg elsőként, majd valamennyi állattörzsben megtalálható különböző fejlettségi állapotban. A ragadozó, illetve növényevő életmód meghatározza a kiválasztott nyál összetételét. Egyes ragadozó életmódot folytató állatok nyálmirigysejtjei méregtermelésre is specializálódtak, mint pl. a *Conus* csigák nyálmirigyei, amelyek a conotoxint termelik, vagy a vérszívó rovarok, férgek nyálmirigyei, melyek antikoaguláns faktorokat termelnek. Eltérően a gerincesektől, a nyálmirigyek szekretoros mirigyvégkamrái a gerinctelenek esetében morfológiailag elkülönülő sejttípusokból épülnek fel. Ezek a különböző sejtek termelik a nyál egyes összetevőit, a fehérjéket, enzimeket, nyákot, mérgeket és antikoaguláns faktorokat. A sejtek összehangolt működését idegi szabályozás tartja fenn. A gerincesekben a nyálmirigy paraszimpatikus kolinerg és szimpatikus adrenerg bemeneteket kap. A gerinctelen szervezetek, köztük pl. a rovarok nyálmirigyében is jelen van a kolinerg szabályozás. Azonban számos szövettani, elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálat támasztotta alá, hogy a rovarokban a nyálmirigy idegi szabályozásában dopamin (DA) a jelentősebb ingerületátvivő. A rovarok nyálmirigyében a DA mellett további más transzmitterek és/vagy modulátorok, mint a szerotonin (5-HT), a proktolin és a nyálzást stimuláló peptid (SG-SASP) is képesek kiváltani nyálfelszabadulást. Noha a csigák pofa dúcaiban kimutatták a táplálkozási rendszert szabályozó DA-erg neuronokat, melyek fontos szerepet játszanak a táplálkozási mintázatgenerátor aktiválásában, a DA nyálmirigyben betöltött pontos szerepét nem tisztázták ezidáig. Továbbá, a csigák nyálmirigyének működésében, hasonlóan a DA-hoz, nem ismerjük a 5-HT és az acetilkolin (ACh) nyáleválasztásban betöltött szabályozó szerepét sem.

A mirigysejtekből a szekréció történhet exocitózissal és holokrin vagy apokrin mechanizmussal. Holokrin szekrécióval működő mirigyek, mind a gerinctelen, mind a gerinces szervezetek körében ismertek, mint pl. a faggyúmirigyek, a madarak uropygiális (tollászkodó) mirigyei, a halak axilláris mirigyei, a Harder mirigyek és a halak, pókok, puhatestűek méregmirigyei. Ezeknél a mirigyeknél, a holokrin szekréció folyamatos váladéktermelést eredményez, így a szekréció kiválasztása a felhasználáskor a tartalékból történik. A holokrin mirigyek végkamra sejtjei a váladéktermelésnél elpusztulnak és az egész sejt szekréttummá alakul át. Egyes szerzők szerint a holokrin szekréció egy szabályozott mechanizmus, amely azonos lehet az apoptózissal vagy a nekrozissal. Leírták, hogy a *Biomphalaria straminea* csiga faj nyálmirigyének sejttípusai holokrin szekréció során szabadulnak meg váladékuktól. A holokrin szekrécióval történő nyálfelszabadulás molekuláris mechanizmusát azonban nem ismerjük.

A puhatestűek (Mollusca) a Földön ma élő második legnagyobb állatcsoport, fajszerében, csak az ízeltlábúak haladják meg. A törzs legnépesebb osztályát a csigák (Gastropoda) alkotják, melyek kevés számú, jól azonosítható idegsejtjeik miatt az idegrendszeri kutatások és különböző fiziológiai folyamatok sejt szintű vizsgálatainak kedvelt objektumaivá váltak. Legnagyobb termetű hazai fajunk, az éti csiga (*Helix pomatia* L., Pulmonata, Gastropoda) nyálmirigyének, mint viszonylag egyszerű modellnek a vizsgálata alapvető ismeretekhez vezethet nyáleválasztás sejt szintű és molekuláris mechanizmusának, valamint az idegrendszer szabályozó és integratív szerepének a megismerésében. A központi idegrendszer és a perifériális szervek közötti kémiai szignalizáció, valamint a modulálás mechanizmusai számos esetben hasonlóak a gerincesekben lejátszódó folyamatokkal, de ezek fajspecifikusak is lehetnek.

## CÉLKITŰZÉSEK

Az éti csiga nyálmirigyének anatómiai felépítéséről, idegi szabályozásáról számos, azonban gyakran ellentmondó, információ áll rendelkezésünkre, szemben az acinus sejtek nyugalmi állapotát fenntartó ionkonduktanciákkal, a mirigysejtek elektromos tulajdonságaival, azok

neurokémiai modulálhatóságával, elektrotónusos kapcsolataival, illetve a nyálfelszabadulás molekuláris mechanizmusával, melyekről nincsenek információink. Munkánk célja az volt, hogy elektrofiziológiai, immuncitokémiai, biokémiai és molekuláris biológiai módszerek segítségével vizsgáljuk a *Helix* nyálmirigyének működését, aminerg és peptiderg modulációját, valamint a nyálfelszabadulás lehetséges celluláris mechanizmusait.

Célul tűztük ki tehát, hogy:

- i) azonosítsuk az éti csiga nyálmirigyét felépítő mirigysejt típusokat
- ii) leírjuk a mirigysejtek elektromos tulajdonságait és jellemezzük az azokat fenntartó ionáramokat, ionpumpa mechanizmusokat
- iii) vizsgáljuk a mirigy összehangolt működésének háttérében álló sejtközi kommunikációs lehetőségeket, azok megjelenését, sejtfelszíni eloszlását
- iv) tanulmányozzuk a nyálszekréció celluláris eseményeit, nyomon kövessük a cisztás sejtek sorsát a nyálfelszabadítás mechanizmusában
- v) teszteljük transzmitterek és modulátorok hatását a nyálszekrécióra
- vi) azonosítsuk a nyálszekréciót hatásosan modulálni képes peptidet vagy peptideket
- vii) vizsgáljuk a sejthalál lehetséges szerepét a nyálszekrécióban, annak befolyásolhatóságát egyrészt transzmitter és modulátor molekulákkal (DA, 5-HT, ACh), másrészt egy ismert antiapoptotikus peptiddel, a PACAP-al

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Kísérleti állatok, preparálás és szövet-előkészítés

Kísérleteinkben a kifejlett *Helix pomatia* aktív, inaktív és hibernált egyedeinek nyálmirigyét használtuk fel.

A relaxált állatokat a bonctálban rögzítettük, majd a bélcsatornát a nyálmiriggyel és a bukkális masszával együtt eltávolítottuk. Ezután a bélről a nyálmirigyet lefejtettük, majd kitűztük. Az elektrofiziológiai kísérletekhez a nyálmirigyet beidegző neuronokat tartalmazó pofadúcokat is kipreparáltuk a miriggyel együtt. A mirigyet 2-3 mm<sup>2</sup>-es darabokra vágtuk, majd ezeket rögzítettük a regisztráló edényben. A kitűzött mirigyeket normál fiziológiás oldattal (mM-ban megadva, 80 NaCl, 4 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 5 MgCl<sub>2</sub>, 10 TRIS-HCl desztillált vízben oldva és beállítva NaOH-al a pH=7,4-re) áramoltattuk 1-2 ml/perc sebességgel.

### Szövettani vizsgálatok

A fénymikroszkópos klasszikus szövettani és az elektronmikroszkópos vizsgálatokra az 1% PFA-t és 2,5% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M PBS-ben fixált majd dehidrált szöveteket Aralditba ágyaztuk, majd félvékony, illetve ultravékony metszeteket készítettünk. Az így készült félvékony metszeteket 1%-os toluidinkék oldattal festettük. Az ultravékony elektronmikroszkópos metszeteket utófixáltuk 1% OsO<sub>4</sub>-ot tartalmazó 0,1 M Na-cacodylat-pufferben, majd JEOL 1200EX készülékkel vizsgáltuk azokat.

A mirigyet a sejttípusok elkülönítésének céljából timsós hematoxilinnal és bázikus fuxinnal, míg a sejtosztódás kimutatására, HE-vel festettük. A festett metszeteket Zeiss Axioplan fénymikroszkópban vizsgáltuk.

### Immuncitokémiai eljárások

Valamennyi általunk alkalmazott módszer az indirekt kétlépéses (fluoreszcens festékekkel, vagy peroxidázzal kapcsolt IgG), illetve a Sternberger-féle (1979) háromlépéses peroxidáz-anti-

peroxidáz eljárás elvén alapult. A szövettelőkészítés során a 4% PFA-t tartalmazó 0,1 M PBS-ben rögzített mintákat 20%-os szacharóz oldatban inkubáltuk, majd Tissue-Tek fagyasztóközegbe ágyasztuk, kriosztátban fagyasztottuk végül 12-16 µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket az elsődleges antitestekkel, majd a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk.

A nyálmirigy korai apoptotikus folyamatainak megjelenítéséhez Annexin V-CY3, valamint TACS-XL – DAB *in situ* apoptózis detektáló kittet használtunk. Az apoptotikus folyamatok során, a mitokondriumban lejátszódó potenciálváltozások nyomon követésére MitoCapture kittet alkalmaztunk.

### **Western-blot analízis**

A nyálmirigy fehérje tartalmát SDS-pufferben történő homogenizálással feltártuk. A homogenizátumot centrifugálással tisztítottuk, a felülúszót eltávolítottuk és SDS-minta-pufferrel 1:1 arányban hígítottuk. A mintákat denaturáltuk, 10-15% SDS-poliacrilamid gélen szeparáltuk a fehérjéket elektroforézissel, majd PVDF membránra elektroblottoltuk azokat. A blotolás után a membránt tejporral blokkoltuk, majd a fehérjéket a megfelelő elsődleges antitestekkel reagáltattuk. Az immunreakciót a másodlagos antitesttel történő inkubálást követően DAB és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal intenzifikáltuk. A minták átlagos, totál fehérje tartalma ~85 µg volt, amit Bradford reagenssel határoztuk meg.

### **Az immunhisztokémia és a WB kontrollkísérletei**

A legtöbb antitestnél preabszorpciós kontroll kísérleteket végeztünk a felismerési szekvenciát specifikusan blokkoló peptiddel. A preabszorpciós kontrollban nem kaptunk jelölést. Az innexin-2 és az aktív-kaspáz-3 antitestek esetében nem rendelkezünk blokkoló peptidekkel, így WB kísérletekben ellenőriztük a specificitást, afrikai vándorsáska nyálmirigy- és patkány agyi-homogenizátumot használva pozitív kontrollként. A WB kísérletek belső kontrolljaként anti-aktin antitestet alkalmaztunk. Minden esetben készítettünk negatív kontrollokat is az elsődleges és a másodlagos antitestek kihagyásával. Mivel a negatív kontroll kísérletek esetében nem detektáltunk jelet, és a pozitív kontrollal megegyező sávokat kaptunk, a kontrollok alapján a csiga minták jeleit specifikusnak tekintettük.

### **Elektrofiziológiai vizsgálatok**

Az ideg ingerlések során a négyszög impulzusokat bipoláris, ezüst elektródán keresztül közvetítettük a pofadúcokat összekötő komiszúrákon keresztül.

Az anyaghatások vizsgálatánál az ACh, 5-HT és DA transzmittereket egy mikroperfúziós rendszerrel perfundáltuk a mérőedényen keresztül. Az anyagok végkoncentrációja soha nem volt magasabb, mint 10<sup>-5</sup>-10<sup>-6</sup> M.

Áramméréseinkben a kálium áramokat TEA és 4-AP specifikus kálium csatorna blokkolók jelenlétében azonosítottuk. A kalcium áramok blokkolása céljából CdCl<sub>2</sub>-ot oldottunk a normál fiziológiás oldatban. A klorid áramok azonosításához acetát ionokkal helyettesítettük a Cl<sup>-</sup>-at izomoláris mennyiségben. A klorid csatornák blokkolására NPPB-t alkalmaztunk.

A mirigysejtek nyugalmi membránpotenciálját, az ideg ingerlésre és anyaghatásra történő elektromos változásokat, valamint az ionáramokat Axoclamp 2B erősítővel erősítettük, majd szűrtük és egy TL-1, illetve Digidata 1200 jelátalakító segítségével digitalizáltuk. Az intracelluláris elektródákat boroszilikát üveg kapillárisokból vertikális elektródahúzóval készítettük. Az MP mérésekben 10-30 MΩ, míg a voltage-clamp mérésekben 4-8 MΩ ellenállású elektródákat alkalmaztunk. Az egy-mikroelektródás voltage-clamp mérésekben a protokollokpClamp 5.7.7. programmal generáltuk. Az elektrofiziológiai adatokat Origin 6.07-es programmal dolgoztuk fel.

## **Programozott sejthalál indukálása és kvantifikálása a nyálmirigyben**

A nyálmirigy sejtekben a programozott sejthalált különböző anyagokkal és a nyálidegen keresztüli elektromos stimulációval váltottuk ki. A szerveket  $10^{-4}$  és  $10^{-8}$  M DA és 5-HT oldatokkal inkubáltuk. Más esetekben, a DA kezelés előtt DA receptor antagonistákkal (fluphenazin, etikloprid), vagy a K-csatorna blokkolókkal (TEA; 4-AP) előinkubáltuk a nyálmirigyeket. A kezelések után a mintákat 4% PFA oldatban rögzítettük, majd 10  $\mu$ m metszeteket készítettünk.

A TACS-XL pozitív (apoptotikus) sejtek számát az egyes állatok nyálmirigyéből (n=6-8) készített metszetek három területének (1,8 mm<sup>2</sup> területet használtunk 400-as nagyításnál) átlagaként határoztuk meg. A specifikusan jelölt (TACS-pozitív) és a nem jelölt (TACS-negatív) sejtek egymáshoz viszonyított arányát egységnyi területen Zeiss Axioplan mikroszkópban számoltuk, majd az átlagértékeket ábrázoltuk oszlopdiagramon a SEM feltüntetésével OriginPro7.5-ös programot használva.

## **Radioimmunoassay (RIA)**

A PACAP27 és PACAP38 tartalom RIA-val történő meghatározásának céljából a mintákat megfelelően előkészítettük. A PACAP38 C-terminális fragmentje (PACAP24-38) és a PACAP27 jodidálva volt és az egyes frakciókat fordított-fázisú HPLC-vel szeparáltuk annak megfelelően. A mono-jodidált formát a RIA mérés nyomjelzőjeként alkalmaztuk. A szintetikus PACAP38 és 27 formákat standardként használtuk. A meghatározás során 100  $\mu$ l antitestet valamint 100  $\mu$ l RIA nyomjelzőt és 100  $\mu$ l PACAP standardot vagy mirigy mintát összemértünk, majd inkubáció után, elkülönítettük az antitest kötött fehérjét a szabad fehérjétől 100  $\mu$ l szeparáló oldattal. A centrifugálást követően a felülúszót óvatosan leöntöttük, és a minták radioaktivitását egy gamma-számlálóban mértük. A nyálmirigy minták PACAP38 és PACAP27 koncentrációja leolvasható volt a megfelelően elkészített kalibrációs görbéről.

## **Citokróm-c meghatározás**

A nagyobb detektálható jel reményében a vizsgálatokban inaktív állatok nyálmirigyét alkalmaztuk. A mirigyek egy részét kontrollként használtuk méréseinkben (n=6; 0,197g) míg másik részüket (n=6; 0,188g)  $10^{-4}$  M DA oldatba áztattuk 30 percig. Ezt követően mindkét mintát homogenizáltuk izo-ozmotikus cukor oldatban. A módosított, eredetileg Whittaker (1965) által leírt differenciált centrifugálási módszer alapján szeparáltuk a mitokondriális és a sejtalkotóktól mentes citoszól frakciót. A tiszta citoszól frakció tartalmazta a leadott citokróm-c molekulákat. A mitokondriális frakcióban a citokróm-c leadását CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával indukáltuk és folyamatosan mértük fotométerrel az áteső fény abszorpcióját. A citokróm-c abszorbanciáját (A) a kontroll és a DA-kezelt mintákban 540 nm-nél spektrofotométerrel mértük. A citokróm-c meghatározott abszorbancia értékeit OriginPro7.5 programmal dolgoztuk fel.

## **EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

A csigák nyálmirigyében alapvetően négy sejttípust különítettünk el félvékony metszeteken toluidinkék festés mellett: a nyálkasejtet, a szemcsés sejtet, a vakuoláris sejtet és a cisztás sejtet. A negyedik sejttípus, a cisztás sejt a vakuoláris sejtek érési folyamatának eredményeképpen alakul ki a vakuólumok összeolvadásával. Véleményünk szerint, ez a sejttípus az aktív állatok nyálmirigyében gyakori és szoros kapcsolatban áll a nyálfelszabadulással. A csigák nyálmirigyére vonatkozó korábbi irodalmi adatok szerint a mirigysejtek igen széles skáláját írták le azonos csigafajok esetében is. Ennek hátterében a szezonális változások mellőzése, illetve az aktív és inaktív állapotok definiálásának a hiánya állhat. A mirigyállományban a különböző



sejttípusok acinusokba tömörülnek, melyekben elszórtan savós és nyákos mirigyvádékot termelő sejteket találtunk. Ebből adódóan a felszabaduló nyál kevert összetételű, amely enzimekben gazdag emésztő- és fehérjékben szegény hígító nyálat tartalmaz.

A HE festéssel az acinusok perifériás területein osztódó sejtek rétegét azonosítottuk. Az osztódó sejteket korai proliferációt detektáló Ki67 antitestekkel is kimutattuk. Ezeknek az osztódó sejteknek a száma aktivitásfüggést mutatott, az aktívan táplálkozó állatok nyálmirigyében erőteljesebb volt a proliferáció. Feltételezések szerint, a cisztás sejtől a nyálfelszabadulás holocrin mechanizmussal történik. Ezt a feltételezést erősítették meg adataink, miszerint az osztódó sejtek mellett a félvékony, toluidinkék festett sorozatmetszeteken intralobuláris nyálvezetékek mentén sejttörmeléket azonosítottunk az aktív állatok nyálmirigyében. A sejttörmelék mennyisége, hasonlóan a proliferatív sejtekhez, függött az állat aktivitási állapotától. Az aktív állatokban a sejttörmelék mennyisége nagyobb volt, mint az inaktív állatok nyálmirigyében. A sejttörmelék az érési ciklus eredményeként pusztuló, a sejthalál klasszikus morfológiai és élettani jellemzőit mutató mirigysejtek maradványa. Az érés során kialakuló cisztás sejtek váladékukat a sejtpusztulás során adják le. Az aktív állatok nyálmirigyében a vacuoláris és cisztás sejtek pusztulási folyamatát apoptózisként azonosítottuk Annexin V-Cy3 és TACS-XL *in situ* apoptózis detektáló kitek segítségével.

A nyálmirigy ultrastruktúrális vizsgálata során különböző típusú membránkapcsolatokat tártunk fel a szomszédos mirigysejtek között. A nem specializált lazább sejtkapcsolatok esetében széles extracelluláris tér volt látható (20 és 150 nm). A szorosabb membránkapcsolatokban a szomszédos sejtek membránja közötti távolság erőteljesen lecsökkent (10-20 nm). Máskor, az egymással parallel futó membránszakaszokon megnövekedett elektron denzitás volt megfigyelhető, elkülönült, széles sejt közötti térrel (~60 nm). Ezt a specializált membránkapcsolatot dezmoszóma-szerű sejtkapcsolatnak azonosítottuk. A szomszédos mirigysejtek klasszikus kommunikációs csatornája, a réskapcsolat (gap-junction) is kimutatható a mirigysejteken, melyet szoros membránkapcsolat jellemez (2-4 nm). Immunhisztokémiai technikát alkalmazva azonosítottuk ennek a specializált mirigykapcsolatnak a háttérben álló molekuláris struktúrákat, az innexineket. Az elektronmikroszkópos felvételeken azonosított elektrotónusos sejtkapcsolatok jelenlétét elektrofiziológiai méréseink is alátámasztották, ugyanis azt találtuk, hogy két egymáshoz közeli, mintegy 7-10 sejt távolságban elhelyezkedő (kb. 300  $\mu$ m) mirigysejt között az ingerület elektrotónusos terjedése jó. A sejt-sejt közötti elektrotónusos kapcsolatok a szegényes beidegzés ellenére biztosítják a mirigy szinkronműködését.

A mirigysejtek MP értéke a -30 és -80 mV-os értéktartomány közé esett, átlagos értéke  $-56,6 \pm 9,8$  mV-nak adódott ( $n=483$ ) normál fiziológiás oldatban. Ez az átlagérték nem mutatott jelentős eltérést a gerincesek, vagy a rovarok exokrin nyálmirigysejtjeinek MP értékétől. A nyugalmi MP fenntartásában elsősorban a  $K^+$ -ok vettek részt, de kimutattuk, hogy az elektrogén Na-pumpák és a  $Cl^-$ -ok szerepe is jelentős.

A mirigysejtek mikroelektródával történő megszúrásuk után általában nem mutattak elektromos aktivitást, azonban egyes esetekben transzmitter felszabadulás okozta spontán miniatűr potenciálokat figyeltünk meg. Alkalmanként, a miniatűr potenciálok összegződtek és EPSP-ok voltak rögzíthetők, de regeneratív AP-t nem detektáltunk. Néha AP-szerű, ún. junctios potenciálokat láttunk, melyek amplitúdója 5 és 25 mV között mozgott.

A mirigysejtekben feszültség-függő inward és outward membrán áramokat regisztráltunk adott lépéssel depolarizálva a sejtet egy-mikroelektródás voltage-clamp technikával. A mérések során meghatároztuk a mirigysejtek működésében részt vevő ionáramokat, úgy mint a  $I_K$ ,  $I_A$ ,  $I_{K(Ca)}$  és az  $I_{Ca}$ -t. A totál outward K-áram 62%-a TEA szenzitív  $I_K$  komponens, míg 27%-a kalcium-függő  $I_{K(Ca)}$  komponens volt. A mirigysejtpopuláció egy részében 4-AP szenzitív  $I_A$  áramkomponens is mérhető volt, ami a totál áram 55%-t tette ki. Az inward áram valószínűleg egy T-típusú kalcium-csatornán keresztül vándorolt és  $Cd^{2+}$ -al 100%-ban blokkolható volt. Ezek az ionáramok határozzák meg és tartják fenn a mirigysejtek elektromos tulajdonságait.

A pofadúcból eredő és a nyálmirigy működését szabályozó nyálideg elektromos ingerlése 30 mV körüli depolarizációt váltott ki a nyálmirigysejtekben. Hasonló depolarizációs válaszokat regisztráltunk, ha a mirigyet  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  M végkoncentrációjú ACh-al, DA-al és 5-HT-al kezeltük. A legerőteljesebb depolarizáló hatása az idegingerlésnek volt. Az idegingerlés, az ACh és a monoamin kezelés hatására kialakuló MP változás a mirigysejtekből kiváltott szekretoros potenciálként azonosítható. A szekretoros potenciál kialakításának hátterében álló idegvégződéseket elektronmikroszkópos felvételeken azonosítottuk a mirigysejtek között. A varikozitások szoros (16-20 nm), de nem specializált kapcsolatokat alakítanak ki a mirigysejtekkel. A különböző transzmitter molekulák hatását a felszabadított nyál mennyiségének mérésével is teszteltük. A szekretoros potenciálok indukálásában a leghatásosabb szignálmolekula az ACh, míg a nyálelválasztás szabályozásában a DA volt. Az idegrendszerben hatásos neuropeptidok, mint pl. MIP, FMRFa, CARP, szekretoros potenciált nem generáltak, azaz feltehetően a nyálelválasztás szabályozásában nincs transzmitter funkciójuk.

Különbséget találtunk az aktívan táplálkozó, illetve inaktív állatok nyálmirigye között a TUNEL-pozitív (apoptotikus) sejtszám tekintetében. Az aktív állatok nyálmirigyében megnövekedett TUNEL-pozitív sejtszám volt detektálható, szemben az inaktív mirigyekkel. A mirigysejtek közül elsősorban a vakuoláris- és cisztás sejtek mutattak TUNEL pozitivitást. Ez arra utalt, hogy a táplálkozás során ezek a sejtek a megfelelő jelre apoptózis során elpusztultak, miközben leadták az általuk termelt nyálat. De mi lehetett az apoptotikus szignált kiváltó jel? Korábbi biokémiai mérések igazolták, hogy a DA koncentrációja az éhes, táplálkozását megkezdő állatok nyálmirigyében szignifikánsan magasabb, mint a jóllakott állatokéban. Eredményeink szerint a nyálelválasztás leghatásosabb transzmittere, a DA, amely képes volt az apoptotikus sejtszámot jelentősen megnövelni az inaktív állatok nyálmirigyében. Hasonló eredményeket kaptunk az idegingerléssel is, mely során többek között DA szabadul fel az idegvégződésekből. A DA a D2 receptoron keresztül fejt ki hatását, ugyanis a receptor eticlopriddal történő szelektív blokkolásakor a DA apoptózis indukáló hatása elmaradt. A TEA, mint az  $I_K$  szelektív blokkolója gátolta a DA apoptózis stimulációját, míg a tranziens K-áramot blokkoló 4-AP hatástalan volt. Ez azt jelentette, hogy a DA apoptózis stimuláló hatását részben a D2 receptorokon hatva, részben pedig a  $K^+$  homeosztázisának befolyásolásával fejt ki.

A DA által kiváltott MP változás (szekretoros potenciál) az intracelluláris  $K^+$  koncentráció csökkentésén keresztül befolyásolja a mitokondriumok transzmembrán potenciálját (MMP) is. Kialakulnak a mitokondrium membránpórusai, melyek elmélyítik a MMP megváltozását. A membránpórusok kialakításában résztvevő számos elem közül az inaktív Bcl2 és az aktív Bad fehérjék részvételét mutattuk ki a mirigysejtekben WB technikával. Az antiapoptotikus (Bcl2) és a proapoptotikus (Bad) fehérjék aránya, amely eldönti a sejt sorsát azáltal, hogy elindul-e az apoptózis intrinszc útvonala, alapvetően függött az állat aktivitási állapotától ill. a DA szinttől. A pro- és antiapoptotikus fehérjék arányát a DA kezelés az aktív Bad molekula felé mozdította el, alátámasztva a DA apoptózist serkentő hatását. A kialakított membránpórusokon keresztül megnőtt a mitokondrium membránjának az áteresztőképessége és a citokrom-c, mint legfontosabb apoptózis indukáló faktor a citoplazmába transzlokálódott. Az inaktív állatok nyálmirigyében a DA kezelés fokozni tudta a citokrom-c mitokondriumból történő felszabadulását. A citokrom-c a kaszpáz-9 és az APAF-1 molekulákkal kialakítja az apoptoszómát, ami az apoptózis legfontosabb szabályozó molekuláját, a kaszpáz-3-at aktiválja az intrinszc apoptotikus szignálban.

Immunhisztokémiai és WB technikával a megfelelő antitestek felhasználása mellett azonosítottuk a cisztás sejtekben az aktív-kaspáz-3-at, mint az apoptózis legfontosabb irányító és végrehajtó molekuláját. Az aktív-kaspáz-3 immunopozitív jeleket a cisztás sejtek citoplazmájában a membránközeli régióban azonosítottuk kizárólagosan. A DA képes volt megemlíni az aktív-kaspáz-3 molekula mennyiségét a jelátviteli mechanizmus eredményeként. Azonban eticloprid jelenlétében a DA kaszpáz-3 aktiváló hatása blokkolható volt. A kaszpáz-8 molekulát, amely az extrinszc és intrinszc útvonalat összekapcsolja, a jelátviteli folyamatokban nem tudtuk kimutatni, így feltételezhető, hogy a klasszikus extrinszc út vonal nem vesz részt a



mirigysejtek apoptotikus folyamataiban. Véleményünk szerint valamely más útvonal és/vagy ezidáig nem azonosított molekula(ák) kapcsolja össze a receptor közvetített DA hatást és az apoptózis intrinsic útvonalát egymással. Ezt alátámasztja az M $\beta$ CD jelenlétében megismételt DA inkubáció alatt tett megfigyelés is. Az M $\beta$ CD gátolja a membránban a ceramid közvetítette lipid-szigetek kiépülését, amelyen a jelátviteli útvonal egyes elemei, mint receptorok, ioncsatornák, enzimek, stb. horgonyoznak. Amikor a ceramidot gátoljuk a lipid-szigetek kiépülése nem történik meg, a szignáltranszdukció sérül, így a DA hatás nem jut el a mitokondriumig, ennek következtében a DA citokróm-c felszabadulást serkentő hatása elmarad. Valószínű, hogy a ceramid kulcs molekulája a jelátviteli folyamatoknak a nyálmirigyben.

A nyálmirigyben megfelelő antitestek felhasználásával PACAP tartalmú mirigysejteket detektáltunk, míg PACAP immunoreaktív idegelemeket, a gerincesek exokrin mirigyeivel ellentétben, nem azonosítottunk. RIA mérések eredményeként kimutattuk a PACAP mindkét formáját a mirigyszövetben, melyek koncentrációja aktivitásfüggést mutatott. Biokémiai méréseinkkel igazoltuk, hogy a PACAP funkcióképes molekula a mirigysejtekben, mivel a PACAP kezelés hatására 50%-al megnövekedett a cAMP koncentrációja (cAMP assay kit, Biorad). Kimutattuk a PACAP antiapoptotikus hatását a mirigysejtekben, ugyanis a DA és a colchicine apoptózist indukáló hatását a PACAP leblokkolta. A PACAP hatás a kaszpáz-3 molekulák esetében is kimutatható volt. A PACAP jelenlétében a DA nem volt képes megemelni az aktív-kaspáz-3 molekula koncentrációját a mirigysejtekben.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja az volt, hogy elektrofiziológiai, immuncitokémiai, biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáljuk a nyálmirigy működését, különös tekintettel a nyálfelszabadulás molekuláris mechanizmusára. Az éti csiga nyálmirigye, mint minden szerv, az idegrendszer irányítása alatt áll. A gerinces mirigysejtektől elektromos tulajdonságaik szempontjából nem különböző egyes mirigysejt típusok acinusokba tömörülnek, melyben elektrotónusosan kapcsolnak egymással. Ez, a viszonylag szegényes beidegzés ellenére biztosítja a nyálmirigy szinkron működését. A mirigysejtek között található idegvégződésekből a nem szinaptikus kapcsolatokon keresztül, az ideg ingerlés során felszabaduló transzmitterek (DA, 5-HT, ACh) szekretoros potenciálok generálnak, melyek hatására a nyálsejtekből megtörténik a nyálfelszabadulás exocitózissal, illetve vacuoláris és cisztás sejtek esetében holokrin szekrécióval. A holokrin szekrécióval egyenértékű folyamatként a nyálsejtek szekréciójában az apoptózis azonosítható. Az apoptózis meghatározott morfológiai és biokémiai elváltozásai, mint foszfatidilserin molekulák külső membránba történő megjelenése, a citoplazmatikus és nukleáris elemek fragmentációja, a fehérjék degradációja és a sejtmembrán felszakadozása megfigyelhető volt a mirigysejtekben. Az elsődleges nyálvezetékek mentén megjelenő sejttörmelék a felszabaduló nyállal eliminálódott. Az apoptózis ebben a formájában a mindennapi nyálsejtek szekréció eszköze, s mint ilyen fiziológiai folyamat. Az apoptózist intrinsic és extrinsic szignálok szabályozzák. Az intrinsic útvonal aktiválódásának eredményeként a mitokondriumból citokróm-c szabadul fel a citoplazmába. Kísérleteink igazolták, hogy a nyálelválasztás molekuláris mechanizmusa során a transzmitterként felszabaduló DA a D2 receptoron keresztül stimulálja a citokróm-c transzlokációját, amely folyamat a pro- és antiapoptotikus Bcl-2 fehérjék szabályozása alatt áll. Mindemellett a fokozott K<sup>+</sup> leadás is képes apoptózist indukálni. A DA stimulálta a mirigysejtekben a TEA szenzitív K-csatornák működését, megnövekedett a K-efflux, ami apoptotikus szignált generált. Az alacsony intracelluláris K<sup>+</sup> koncentráció közvetlenül is képes fokozni a kaszpáz-3 aktivációját. Igazoltuk, hogy a DA a D2 receptorokon közvetlenül illetve a K<sup>+</sup> homeosztázisán keresztül képes az apoptózis végrehajtó molekuláját, a kaszpáz-3-at aktiválni. A nyálelválasztásban az extrinsic és intrinsic útvonalakat összekapcsoló folyamat ez idáig ismeretlen, ugyanis a kapcsoló molekulát, a kaszpáz-8-at nem sikerült kimutatni a jelátviteli

mechanizmusban. DA által aktivált apoptotikus folyamatok hatásosan blokkolhatók az éti csiga egyik endogén peptidjével, a PACAP-al. A PACAP hatás célmolekulája a kaszpáz-3 molekula.

## KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Functional morphology of the salivary gland of the snail, *Helix pomatia*. **Acta Biol. Hung**; 55:1-4. IF: 0,447
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2006): Electrical properties and cell-to-cell communication of the salivary gland cells of the snail, *Helix pomatia*. **Comp. Biochem. Phys. Part A**; 145:7-19. IF: 1,553
- Pirger, Zs., Németh, J., Hiripi, L., Tóth, G., Kiss, P., Lubics, A., Tamás, A., Hernádi, L., Kiss, T., Reglődi, D. (2008): PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. **J. Mol. Neurosci.**; in press. IF: 2,965
- Hernádi, L., Pirger, Zs., Kiss, T., Németh, J., Márk, L., Kiss, P., Tamás, A., Lubics, A., Tóth, G., Shioda, S., Reglődi, D. (2008): The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the snail *Helix pomatia*. **Neuroscience**; 155(2):387-402. IF: 3,427
- Pirger, Zs., Rácz, B., Kiss, T. (2009): Mitochondrial-caspase dependent programmed cell death provides a physiological mechanism for mucus release from the snail salivary gland. **Biol. Cell**; in press. IF: 4,303

### A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások, posztterek

- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2003): Morphological changes accompanying the saliva production in the salivary gland of the snail, *Helix pomatia*. 10<sup>th</sup> Symp. Invertebr. Neurobiol. (ISIN), Tihany (abstract).
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Aminergic and peptidergic regulation of the snail salivary gland: electrophysiology and immunocytochemistry. IBRO-MITT Internat. Workshop, Budapest. **Clinical Neurosci., Ideggyógyászati Szemle**, 57:75, 1. különszám.
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Aminergic and peptidergic regulation of the snail gland: electrophysiology and immunocytochemistry. IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2004, Budapest (abstract).
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2004): Aminergic and peptidergic regulation of the snail gland: electrophysiology and immunocytochemistry. 4<sup>th</sup> Forum Europ. Neurosci. (FENS), Lisbon, Portugal, abstract no. A-082.
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2005): Electrical properties and voltage-gated ion-channels of the snail, *Helix pomatia*, salivary gland cells. A Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen (abstract)
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T. (2005): Electrical properties and voltage-gated ion-channels of the salivary gland cells of the snail, *Helix pomatia*. 15<sup>th</sup> IUPAB and 5<sup>th</sup> EBSA Internat. Biophysics Congress, France, Montpellier. **Eur. Biophys. J.** 34:651, number 6., abstract no. P-276.
- Pirger, Zs., Kiss, T. (2006): Nyálfelszabadulás apoptózissal az éti csiga nyálmirigysejtjeiből. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, abstract no. A-0020.
- Pirger, Zs., Kiss, T., Németh, J., Hernádi, L., Reglődi, D. (2007): The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC-R) in the snail; *oral presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Pirger, Zs., Reglodi D, Hernadi L, Nemeth J, Toth G, Kiss P, Lubics A, Kiss T. (2007): PACAP has antiapoptotic effect in the salivary gland of a molluscan species, *Helix pomatia*. 8<sup>th</sup> Symposium on VIP, PACAP, and Related Peptides, Manchester and Burlington, Vermont, USA; **J. Mol. Neurosci.** 33: 333.

### Egyéb közlemények

- Pirger, Zs., László, Z., Kiss, T. (2006): G-protein coupled receptor kinase-like immunoreactivity in the snail, *Helix pomatia*, neurons. **Brain Res.**; 1122(1):10-7. IF: 2,341
- Nikitin, ES., Vavoulis, DV., Kemenes, I., Marra, V., Pirger, Zs., Michel, M., Feng, J., O'Shea M., Benjamin PR, Kemenes, G. (2008): Persistent sodium current is a nonsynaptic substrate for long-term associative memory. **Curr. Biol.**; 18(16):1221-1226. IF:10,539

### Könyvfejezet

- Kiss, T., Pirger, Zs., (2006): Neuropeptides as modulators and hormones in terrestrial snails: Their occurrence, distribution and physiological significance. – part 4. **Transworld Research Network**, (ISBN: 81-7895-224-6), Invertebrate neuropeptides and hormones: Basic knowledge and recent advances; Editor: Honoo Satake, Kerala, India

### Egyéb konferencia előadások, poszterek

- Pirger, Zs., Szappanos, H., Gönci, M. (2003): Purinerg signaling mechanisms in cultured mouse skeletal muscle cells. 9<sup>th</sup> Conference of the Hung. Neurosci. Soc., Balatonfüred; **Clinical Neurosci., Ideggyógyászati Szemle**, 56:71, 2. különszám.
- Pirger, Zs., László, Z., Kiss, T. (2005): Occurrence and the role of G-protein coupled receptor kinase in the desensitization of mytilus-inhibitory peptide receptors in *Helix pomatia*. 11<sup>st</sup>. MITT kongresszus, Pécs; **Clinical Neurosci., Ideggyógyászati Szemle**, 58:77, 1. különszám.
- Pirger, Zs., László, Z. and Kiss, T. (2006): G-protein coupled receptor kinase-like immunoreactivity in the snail, *Helix pomatia*. 5th Forum of European Neuroscience (FENS), Vienna, Austria, abstract no. A-048.20.
- Pirger, Zs., Juhász-Vedres, G., Kiss, T. (2007): Distribution and localization of different sodium channel subtypes in snail; *poster presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Kiss, T., Pirger, Zs., Kemenes, G., (2007): Food-aversive conditioning increases persistent Na-current in withdrawal interneurons; *poster presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Hiripi, L., Pirger, Zs., Kiss, T., Elekes, K. (2007): Protein phosphorylation in the heart and foot of *Helix pomatia* during active state; *oral presentation*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary
- Pirger, Zs., Elekes, K., Kiss, T., Hiripi, L. (2007): Activity state of *Helix pomatia* is regulated by a serotonin-receptor coupled to adenylyl-cyclase; *poster presentation*. Society for Neuroscience, San Diego, California, USA
- Kiss, T., Pirger, Zs. (2008): A perzisztens Na-csatornák és szerepük az elemi tanulásban; előadás. 38. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország
- Reglodi, D., Pirger, Zs., Mark, L., Nemeth, J., Hiripi, L., Kiss, P., Lubics, A., Tamas, A., Kiss, T. (2008): Activity-dependent changes in the protein composition of *Helix pomatia* with special reference to pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide; 24. Conference of European Comparative Endocrinologists (CECE), Genoa, Italy